

氏 名	こ ばやし あや 小 林 綾
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1653 号
学位授与の日付	平 成 19 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Mechanism of membrane lipid efflux by ABC proteins (ABC タンパク質による膜脂質排出機構の解明)

論文調査委員 (主 査) 教 授 植 田 和 光 教 授 阪 井 康 能 教 授 植 田 充 美

論 文 内 容 の 要 旨

コレステロールやリン脂質は細胞膜の構成成分であるだけでなく、胆汁酸や種々のホルモンの前駆体として必須である。コレステロールは肝臓で合成されるとともに小腸から食物中のコレステロールが吸収されて肝臓に輸送され、低密度リポタンパク質 (LDL) の形で末梢細胞へと運ばれる。末梢細胞の余剰コレステロールは高密度リポタンパク質 (HDL) を介して肝臓へ戻され、胆汁酸合成に利用されたりそのまま胆汁中に排泄されたりする。この HDL を介した末梢細胞から肝臓へのコレステロールの逆転送は、体内のコレステロール恒常性維持において非常に重要なシステムである。

近年、多くの ATP-binding cassette (ABC) タンパク質が生体の脂質恒常性維持に働くことが分かりつつある。ABCA1 はアポリタンパク質依存的にコレステロールとリン脂質を細胞外へ排出し HDL 新生に重要な役割を果たしている。ABCG1 は HDL へコレステロールを排出すると考えられるが詳細な脂質排出機構は明らかになってない。また、胆汁生成時には、ABCB11 (BSEP) が肝臓から毛細胆管中に胆汁酸を排出すると同時に、ABCB4 がリン脂質を協調的に排出している考えられているが、その詳細は明らかでない。

本研究では、脂質恒常性維持に重要な役割を果たす ABC タンパク質の中でも ABCG1 と ABCB4 に着目し、細胞内局在と脂質排出機構を解析した。本論文の主な内容は以下のとおりである。

第一章では、ABCG1 を安定発現した HEK293 細胞を樹立し、ABCG1 の細胞内局在と脂質排出能を解析した。ABCG1 はホモ二量体を形成して細胞膜に局在し、ATP 結合・加水分解依存的にコレステロールとリン脂質を排出することを明らかにした。ABCA1 が apoA-I に依存して脂質を排出するのに対し、ABCG1 は HDL を最適なアクセプターとして脂質を排出するが、特異性は低く、血清アルブミンもアクセプターとして機能しうることを示した。また、ABCA1 はリン脂質のうち、ホスファチジルコリンを主に排出するのに対し、ABCG1 はスフィンゴミエリンを優先的に排出することが分かった。以上の結果から、ABCG1 は ABCA1 と協調してコレステロールとリン脂質を排出し、HDL 形成に関与していることが示唆された。

第一章の結果から、ABCG1 がスフィンゴミエリンを優先的に排出することが分かった。そこで、第二章では細胞膜のスフィンゴミエリン量の変化が、ABCG1 によるコレステロール排出に影響を与えるかどうかを、セラミド輸送タンパク質である CERT に変異をもつ CHO-K1 細胞の変異株 LY-A を用いて解析した。CERT の機能はスフィンゴミエリン合成に必須であり、LY-A 細胞では細胞内スフィンゴミエリンが約 40% 減少している。LY-A 細胞では、ABCG1 によるコレステロール排出およびスフィンゴミエリン排出が大幅に減少することが分かった。一方、CERT を過剰発現させ細胞内スフィンゴミエリン量を増加させると、ABCG1 によるコレステロール・スフィンゴミエリン排出が増加した。細胞膜の総コレステロール量は CERT の変異による影響を受けなかったが、LY-A 細胞ではラフトの崩壊により非ラフト領域のコレステロールが増加していることが示唆された。以上の結果は、ABCG1 による脂質排出は細胞内スフィンゴミエリン量と細胞膜中のコレステロール分配によって調節される可能性を示唆する。

第三章では、胆汁中へのリン脂質排出に関与すると考えられている ABCB4 の機能解析を行った。ABCB4 は、薬剤輸送に関与する MDR1 (ABCB1) とアミノ酸配列が 80% 以上相同性をもつにもかかわらず、薬剤輸送活性をもたない。まず、MDR1 および ABCB4 を安定発現した HEK293 細胞を樹立し、MDR1 と ABCB4 による脂質排出を比較した。両者とも、通常の培地中には脂質を排出しなかった。しかし、タウロコール酸を培地に添加すると ABCB4 はホスファチジルコリンとコレステロールを排出した。一方、MDR1 はタウロコール酸を添加しても、脂質排出活性を示さなかった。ABCB4 による脂質排出はグリココール酸、コール酸と比べてタウロコール酸によって最も強く促進された。光散乱法を用いた解析によって、タウロコール酸単量体が ABCB4 による脂質排出に関与していることが明らかになった。ABCB4 の ATP 結合領域の変異体は、タウロコール酸存在下でもリン脂質とコレステロールを排出しなかった。以上の結果から、ABCB4 は、胆汁酸をアクセプターとし、ATP 結合・加水分解に依存してホスファチジルコリンとコレステロールを排出することで胆汁生成に重要な役割を果たすことが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

コレステロールやリン脂質は細胞膜の構成成分であるだけでなく、胆汁酸や種々のホルモンの前駆体として必須である。コレステロールは細胞内で合成されると共に小腸から食物中のコレステロールが吸収されて肝臓に運ばれ、末梢細胞へと輸送される。末梢細胞で過剰となったコレステロールは細胞毒性をもつため体内の脂質恒常性は厳密に維持されている。最近、多くの ABC (ATP-Binding Cassette) タンパク質が脂質の恒常性維持に関与することが明らかになりつつある。ABCG1 はマクロファージを含む様々な組織で発現し、細胞内から細胞外への脂質排出に関与すると考えられている。また、ABCB4 は肝臓に特異的に発現し、胆汁中へのリン脂質排出に関与すると考えられている。しかし、ABCG1 と ABCB4 による脂質排出メカニズムはいまだ明らかになっていない。コレステロールの過剰摂取による脂質恒常性の破綻は様々な生活習慣病を引き起こすことから、現代人の大きな問題となっている。体内恒常性維持に関わる ABC 蛋白質の機能解明はますます重要性を増している。

本論文は、体内の脂質恒常性維持において重要な役割を果たしている ABCG1 と ABCB4 の機能を解析したものであり、ABCG1 がスフィンゴミエリンを排出すること、ABCB4 が胆汁酸依存的にホスファチジルコリンを排出することを初めて明らかにした。評価すべき点は以下の通りである。

1. ABCG1 は細胞膜に局在してホモ二量体を形成することを明らかにした。
2. ABCG1 は HDL を最適なアクセプターとして ATP 結合・加水分解依存的に脂質を排出する。しかし、ABCG1 による脂質排出のアクセプターの特異性は低く、血清アルブミンもアクセプターとして機能することを明らかにした。
3. ABCA1 はコリンリン脂質のうち、ホスファチジルコリンを主に排出するのに対し、ABCG1 は細胞膜中のスフィンゴミエリンを優先的に排出することを明らかにした。
4. ABCG1 による脂質排出は細胞内のスフィンゴミエリン量と細胞膜のコレステロール分配によって調節される可能性を示した。
5. ABCB4 は胆汁酸依存的にホスファチジルコリンとコレステロールを排出し、胆汁酸ではグリココール酸、コール酸と比べてタウロコール酸が最適であることを示した。
6. 光散乱法を用いることによって、タウロコール酸単量体が ABCB4 による脂質排出のアクセプターとして働いていることを示唆した。
7. ABCB4 による脂質排出は ATP 結合・加水分解依存的であり、二つの ATP 結合領域の両方が必要であることを明らかにした。

以上のとおり、本論文は、体内の脂質恒常性維持において重要な役割を果たしている ABCG1 と ABCB4 の機能を明らかにしたものであり、生化学、分子生物学、細胞生物学、基礎生理学に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 19 年 4 月 12 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。